

## 日 本 国 特 許 庁

14.06.00

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 04 AUG 2000

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

1999年 6月21日

F (K) U

出 願 番 号  
Application Number:

平成11年特許願第174624号

7/2

出 願 人  
Applicant (s):

第一化学薬品株式会社

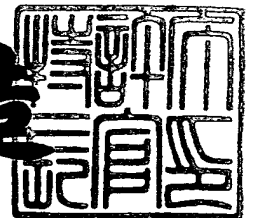
09/926818

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 7月21日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2000-3057412

【書類名】 特許願

【整理番号】 9910028

【提出日】 平成11年 6月21日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明の名称】 コレステロール定量用試料の前処理方法およびこれを利用する特定のリポ蛋白中のコレステロール定量法

【請求項の数】 19

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県龍ヶ崎市向陽台3丁目3番1号 第一化学薬品株式会社 診断薬研究所内

    【氏名】 中村 光浩

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県龍ヶ崎市向陽台3丁目3番1号 第一化学薬品株式会社 診断薬研究所内

    【氏名】 谷口 由利子

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県龍ヶ崎市向陽台3丁目3番1号 第一化学薬品株式会社 診断薬研究所内

    【氏名】 真鍋 満久

【特許出願人】

    【識別番号】 390037327

    【氏名又は名称】 第一化学薬品株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100086324

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 小野 信夫

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 007375

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9711409

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 コレステロール定量用試料の前処理方法およびこれを利用する特定のリポ蛋白中のコレステロール定量法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 試料中の特定のリポ蛋白中に存在するコレステロールを測定するに先立ち、リポ蛋白を含む試料に遊離型コレステロールを基質とする酵素を作用させることを特徴とするコレステロール定量用試料の前処理方法。

【請求項 2】 遊離型コレステロールを基質とする酵素が、コレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼである請求項第 1 項記載の前処理方法。

【請求項 3】 リポ蛋白を含む試料に遊離型コレステロールを基質とする酵素を作用させた後、特定のリポ蛋白のみに作用する物質を利用して特定のリポ蛋白中に存在するコレステロールを測定することを特徴とする特定のリポ蛋白中のコレステロール定量法。

【請求項 4】 遊離型コレステロールを基質とする酵素が、コレステロールオキシダーゼ及び又はコレステロールデヒドロゲナーゼである請求項第 3 項記載の測定方法。

【請求項 5】 特定のリポ蛋白が高比重リポ蛋白である請求項第 3 項または第 4 項記載の測定方法。

【請求項 6】 遊離型コレステロールを基質とする酵素を含み、リポ蛋白に作用する物質を実質的に含まないコレステロール測定用試料の前処理剤。

【請求項 7】 遊離型コレステロールを基質とする酵素を含み、コレステロールエステラーゼを実質的に含まないコレステロール測定用試料の前処理剤。

【請求項 8】 遊離型コレステロールを基質とする酵素がコレステロールデヒドロナーゼまたはコレステロールオキシダーゼである請求項第 6 項または第 7 項記載のコレステロール測定用試料の前処理剤。

【請求項 9】 次の試薬、

(1) コレステロールオキシダーゼおよび過酸化水素消費物質を含む第 1 試薬

- (2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質、コレステロールエステラーゼおよび発色剤を含む第2試薬

よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

【請求項10】 次の試薬、

- (1) コレステロールデヒドロゲナーゼおよび補酵素を含む第1試薬、  
(2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質およびコレステロールエステラーゼを含む第2試薬

よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

【請求項11】 次の試薬、

- (1) コレステロールデヒドロゲナーゼおよび補酵素を含む第1試薬、  
(2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質、コレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、パーオキシダーゼおよび発色剤を含む第2試薬

よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

【請求項12】 次の試薬、

- (1) コレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼおよび過酸化水素消費物質を含む第1試薬、  
(2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質および発色剤を含む第2試薬

よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

【請求項13】 次の試薬、

- (1) コレステロールデヒドロゲナーゼ、補酵素およびコレステロールエステラーゼを含む第1試薬、  
(2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質を含む第2試薬

よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

【請求項14】 次の試薬、

- (1) コレステロールデヒドロゲナーゼ、補酵素およびコレステロールエステラーゼを含む第1試薬、  
(2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質、コレステロールオキシダーゼ、パーオキシダーゼおよび発色剤を含む第2試薬

よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

【請求項 15】 次の試薬、

(1) コレステロールオキシダーゼおよび過酸化水素消費物質を含む第 1 試薬

(2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質を含む第 2 試薬、

(3) コレステロールエステラーゼおよび発色剤を含む第 3 試薬

よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

【請求項 16】 次の試薬、

(1) コレステロールデヒドロゲナーゼおよび補酵素を含む第 1 試薬、

(2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質を含む第 2 試薬、

(3) コレステロールエステラーゼを含む第 3 試薬

よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

【請求項 17】 次の試薬、

(1) コレステロールデヒドロゲナーゼおよび補酵素を含む第 1 試薬、

(2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質を含む第 2 試薬、

(3) コレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、パーオキシダーゼおよび発色剤を含む第 3 試薬

よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

【請求項 18】 次の試薬、

(1) コレステロールデヒドロゲナーゼ、補酵素および補酵素反応生成物消費物質を含む第 1 試薬、

(2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質およびコレステロールエステラーゼを含む第 2 試薬

よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

【請求項 19】 次の試薬、

(1) コレステロールデヒドロゲナーゼ、補酵素および補酵素反応生成物消費物質を含む第 1 試薬、

(2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質、コレステロールエステラーゼおよび発色剤を含む第 2 試薬

よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、少ない試料で簡便な操作により、正確に、効率良く特定画分に存在するコレステロールを分離定量するための前処理方法およびこれを用いる特定画分中のコレステロール測定方法に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

コレステロール等の脂質は、血漿中においてアポ蛋白と共にリポ蛋白質を形成している。このリポ蛋白質は物理的な性状の違いにより、カイロミクロン、超低比重リポ蛋白（VLDL）、低比重リポ蛋白（LDL）、高比重リポ蛋白（HDL）等に分類される。これらのリポ蛋白質のうち、LDLは動脈硬化を引き起こす原因物質の一つであり、一方HDLは抗動脈硬化作用を示す事が知られている。

【0 0 0 3】

すなわち、疫学的にいえば、LDL中のコレステロール値は、動脈硬化性疾患の発症頻度と正相関を示し、一方、HDL中のコレステロール値は動脈硬化性疾患の発症頻度と逆相関を示す事が知られている。従って、今日では、虚血性心疾患の予防や診断を目的としてLDL中やHDL中のコレステロールの測定が広く行われている。

【0 0 0 4】

このLDLやHDL中のコレステロールの測定法としては、たとえば超遠心分離によってLDLやHDLを、他のリポ蛋白と分離した後、コレステロール測定に供する方法や、電気泳動によって分離した後に脂質の染色を行って、その発色強度を測定する方法が知られている。しかしながら、これらの方法は、いずれも、操作が煩雑であったり、多数の検体を処理できないなどの問題があり、日常的にほとんど用いられていない。

【0 0 0 5】

現在、HDL中のコレステロールの測定方法として、臨床検査の領域で用いられている方法には、検体に沈澱剤を加えてHDL以外のリポ蛋白を凝集させ、これを遠心分離によって取り除き、分離されたHDLのみを含む上清中のコレステロールを測定する沈澱法がある。この方法は、超遠心法や電気泳動法に比較して簡便であるものの、沈澱剤を加えて分離する操作を含むために、比較的多量の検体量を要し、また、分析誤差を生じる可能性も高く、全分析工程を完全に自動化する事はできなかった。

## 【0006】

一方、酵素的にHDL中のコレステロールを分別定量する方法も検討されている。たとえば、胆汁酸塩及び非イオン系界面活性剤の存在下に、酵素反応を行う方法（特開昭63-126498号）が知られている。この方法は、反応初期の酵素反応はLDL中のコレステロール濃度に比例し、その後の反応速度はHDL中のコレステロール濃度に比例する事を利用したものであるが、HDL中のコレステロールと他のリポ蛋白質中のコレステロールの反応を完全に分別する事はできず、正確性に問題があった。

## 【0007】

また、HDL以外のリポ蛋白質をあらかじめ凝集させておき、HDL中のコレステロールのみを酵素的に反応させた後に、酵素を失活させると同時に凝集を再溶解して吸光度を測定するという方法（特開平6-242110号）が知られている。しかしながら、この方法は少なくとも3回の試薬を添加する操作が必要であるため、限定された自動分析装置にしか適用できず、汎用性の点で問題があった。また、沈澱の再溶解に際しては、高濃度の塩を使う等、分析器機に対するダメージや試薬廃棄の点でも満足できるものではなかった。

## 【0008】

更に第一反応中に、特殊な界面活性剤の存在下でコレステロールオキシダーゼ及びコレステロールエステラーゼをHDL以外のリポ蛋白に作用させ、これらに含まれるコレステロールを優先的に作用させたのち、HDL以外のコレステロールに対する反応を抑制しながらHDL中のコレステロールを測定する方法（特開平9-299号）も知られているが、第一反応中でHDL以外のリポ蛋白の遊離



型及びエステル型コレステロールの両方を反応系外に導くための特殊な界面活性剤とコレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼを同時に必要とする点などで本発明と大きく異なっている。

## 【0009】

更にまた、特許第2600065号では、HDL以外のリポ蛋白を沈殿させる沈殿試薬とコレステロール測定試薬を組み合わせて使用し、沈殿しないHDL中のコレステロール(HDL-C)を測定する方法が開示されるが、実際には修飾した酵素と硫酸化 $\alpha$ -シクロデキストリンを沈殿剤として用いる場合に実施可能性のある方法であり、また沈殿剤の効果によって生じる濁りが測定系に妨害を与えてしまうなど、精度の点でも問題のある測定法であった。

## 【0010】

上記の特許方法についての論文発表とされる「生物試料分析」、第19巻、第5号の第305頁から第320頁では、修飾酵素によるHDL-Cの測定について、修飾酵素を反応系に導入するだけではプラス誤差を与える(沈殿法に比べ、高い値が出る)ため、高脂血症患者血清中のHDL-Cは測定できないことを認めた上で、これをさけるためにポリアニオンの1種である硫酸化シクロデキストリンと塩化マグネシウムを沈殿剤として用い、HDL-Cを測定したことを報告している。

## 【0011】

上記特許方法の沈殿剤によって生ずる濁りの影響を軽減するために界面活性剤を共存させる(特開平8-116996号)技術や、抗体を使用する(特開平9-96637号)、糖化合物を使用する(特開平7-301636号)等の技術もあるが、これらはいずれも凝集生成を引き起こす試薬が含まれることを条件とするものであり、基本的にポリアニオン等の沈殿剤の使用はさけられないものであった。

## 【0012】

最近本発明者らは、特定のリポ蛋白のみに作用する物質を利用することにより、沈殿剤を使用しなくても特定画分中のコレステロールを正確に定量しうることを見だし、特許出願した(特願平9-244821号)。この方法は、従来の

沈殿法とは極めて相関性が高いものであるが、沈殿法との測定値の関係では、上記「生物試料分析」で報告されたのと同様な傾向が認められており、医療機関などで従来の沈殿法と継続したデータを得るために、ポリアニオン等が添加されていた。

#### 【0 0 1 3】

しかしながら、ポリアニオン等を加え、測定系中に沈殿を生じさせることは、セルの汚れ等の問題や、測定値のばらつきの関係から望ましいものでなく、系中からの沈殿物の追放が強く求められていた。更に、測定原理上は不必要なポリアニオン等を、データを一致させるためだけに用いることは経済的にも不合理なことであり、その解決も求められていた。

#### 【0 0 1 4】

##### 【発明が解決しようとする課題】

従って、本発明は基本的にポリアニオン等を必須とせず、簡便な操作で正確に、かつ効率よく特定画分中のコレステロールを定量する事ができ、種々の自動分析装置に好適に使用される方法を提供することを課題とする。

#### 【0 0 1 5】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者等は、前記「生物試料分析」中で報告された、HDL等の特定のリポ蛋白のみに作用する物質を利用した特定画分中のコレステロールの定量値が沈殿法の値より高くでる原因について追求していたところ、測定されるHDL画分以外のリポ蛋白からも表面ないしその極近傍に存在する少量の遊離型コレステロールが引き出され、これが正誤差を生じる原因であるとの結論を得た。そして、この知見に基づき、リポ蛋白が実質的に変化しない条件で遊離型コレステロールのみを予め消費してからコレステロール値を測定すれば、特定のリポ蛋白のみに作用する物質を利用した定量法の値と沈殿法での値が一致することを見だし、本発明を完成した。

#### 【0 0 1 6】

すなわち本発明は、試料中の特定のリポ蛋白中に存在するコレステロールを測定するに先立ち、リポ蛋白を含む試料に遊離型コレステロールを基質とする酵素

を作用させることを特徴とするコレステロール定量用試料の前処理方法を提供するものである。

【0017】

また本発明は、リポ蛋白を含む試料に遊離型コレステロールを基質とする酵素を作用させた後、特定のリポ蛋白のみに作用する物質を利用して特定のリポ蛋白中に存在するコレステロールを測定することを特徴とする特定のリポ蛋白コレステロール定量法を提供するものである。

【0018】

【発明の実施の形態】

本発明においては、試料中の特定のリポ蛋白中に存在するコレステロールを測定するに先立ち、まず前処理として試料に遊離型コレステロールを基質とする酵素を作用させ、遊離型コレステロールを消費する。

【0019】

遊離型コレステロールを基質とする酵素としては、例えばコレステロールデヒドロナーゼ、コレステロールオキシダーゼなど遊離型コレステロールを基質とするものならばいずれでも差し支えない。これらは、微生物由来、動物由来、植物由来など、いずれでも、また遺伝子操作により作られたものでも良い。また化学修飾の有無も問わない。上記酵素は、一般的には0.001単位～100単位／mlで、好ましくは0.1単位～100単位／mlで使用される。

【0020】

試料に上記遊離型コレステロールを基質とする酵素を作用させるための条件は、特に制約はなく、当該酵素について推奨される条件でよい。しかしながら、試料に遊離型コレステロールを基質とする酵素を作用させる段階において、エステル型コレステロールを遊離型コレステロールに変換する反応が生じないように注意する必要がある。すなわち、コレステロールエステラーゼの有無は問題ではないが、これを実質的に作用せしめない条件を維持する必要がある。

【0021】

前記の遊離型コレステロールを基質とする酵素は必要に応じて、補酵素を使用することができ、補酵素としてはニコチンアミドアデニンジヌクレオチドなどが

使用できる。これらの酵素は、単独で、或いは2種以上を組み合わせ用いる事ができ、またその使用量は酵素によって異なり、特に制限されるものではないが0.001単位～100単位/mlで、好ましくは0.1単位～100単位/mlで使用される。

#### 【0022】

また、前記の遊離型コレステロールを基質とする酵素と同時に、更に測定の特異性を損なわず酵素の作用を調整する目的で、また、特定のリポ蛋白の凝集を生じない範囲で、他の酵素や塩、pH調整のための緩衝剤、界面活性剤、防腐剤、アルブミンなどの蛋白質類、抗体、抗生物質、サポニン、レクチン、ポリアニオンなど特定のリポ蛋白に親和性を有する試薬を使用することもできる。

#### 【0023】

従って、本発明において、試料中の特定のリポ蛋白中に存在するコレステロールを測定するための前処理剤として、次のような構成成分を含んだものを利用することができる。

#### 【0024】

(必須成分)

例えばコレステロールデヒドロナーゼ、コレステロールオキシダーゼなどの遊離型コレステロールを基質とする酵素。

(その他成分)

例えばNAD等の補酵素、パーオキシダーゼ、カタラーゼ、ジアホラーゼ、アスコルビン酸酸化酵素などの他の酵素、ピルビン酸などの酸、塩、pH調整のための緩衝剤、リポ蛋白に実質的に影響を与えない界面活性剤、防腐剤、アルブミンなどの蛋白質類、抗体、抗生物質、サポニン、レクチン、ポリアニオン、4-アミノアンチピリン等のカップラー、トリンダー試薬等の水素供与体など酸化系発色試薬類、フェナジンメトサルフェート等の電子受容体類、ニトロブルーテトラゾリウム等の還元系発色試薬類。

#### 【0025】

本発明においては、上記前処理によりリポ蛋白中の遊離型コレステロールを消費させた後、試料中の特定のリポ蛋白中に存在するコレステロールを測定する。

【0026】

試料中の特定のリポ蛋白中に存在するコレステロールを測定する方法としては、特定のリポ蛋白のみに作用する物質を利用して当該リポ蛋白中に存在するコレステロールを測定することができる方法であれば何れの方法をも利用することができる。

【0027】

その方法の一例としては、例えば、特開平 11-56395 号に開示のポリオキシエチレンアルキレンフェニルエーテル及びポリオキシエチレンアルキレントリベンジルフェニルエーテルから選ばれる界面活性剤を特定のリポ蛋白のみに作用する物質とし、その存在下、コレステロール測定用酵素試薬を添加し、リポ蛋白質のうち、高比重リポ蛋白質中のコレステロールが優先的にコレステロール測定用酵素試薬と反応する時間内にそのコレステロールの反応量を測定する方法が挙げられる。このうち前者のポリオキシエチレンアルキレンフェニルエーテルの市販品の例としてはエマルゲン A-60（花王社製）などが、後者のポリオキシエチレンアルキレントリベンジルフェニルエーテルの市販品の例としてはエマルゲン B 66（花王社製）等があげられる。

【0028】

また、特定のリポ蛋白に対する反応性を有する界面活性剤（特開平 8-201393 号、特開平 9-313200 号）を特定のリポ蛋白のみに作用する物質として使用することもできる。

【0029】

更に、別の方法としては、生物試料分析、第 19 巻、第 5 号の第 305 頁から第 320 頁に開示の修飾酵素を、特定のリポ蛋白のみに作用する物質として用いる方法が挙げられる。この文献の方法では、HDL 以外のリポ蛋白画分の反応を抑制するために硫酸化  $\alpha$ -シクロデキストリンと塩化マグネシウムを用いているが、本発明の前処理方法を利用すればこれらを使用する必要はなくなる。

【0030】

特定のリポ蛋白中に存在するコレステロールを測定する方法は、特定のリポ蛋白のみに作用する物質を利用する以外は、通常のコレステロールの測定方法に用

いる試薬により実施することができる。用いられる試薬に含まれる成分としては、例えば、コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼ、コレステロールデヒドロゲナーゼ、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ、ジアホラーゼ、パーオキシダーゼなどの酵素類、発色剤、補酵素、電子受容体、蛋白質（アルブミン等）、防腐剤、界面活性剤、塩、酸、pH調整のための緩衝剤等が挙げられる。

## 【0031】

上記成分のうち、界面活性剤としては、イオン性、非イオン性のいずれのものも使用することができ、例えばポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンーポリオキシプロピレン縮合物、ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩、アルキルベンゼンスルホン酸塩、胆汁酸類等が挙げられる。この界面活性剤の使用量は化合物によって異なり、特に制限されるものではないが0.0001%～5%で、好ましくは0.001%～5%で使用される。

## 【0032】

また、緩衝剤としては、特に制約なく、グッドの緩衝剤、りん酸、トリス、フタル酸塩など一般的なものを使用できる。また、その使用量も特に制限させるものではないが0.005M～2M、好ましくは0.01～1Mで使用される。

## 【0033】

本発明により特定のリポ蛋白画分中のコレステロールを定量する方法は、典型的には、まず測定試料中に遊離型コレステロールのみに作用する前処理剤を添加作用させた後に、特定のリポ蛋白のみに作用する物質と通常のコレステロールの測定方法に用いる試薬を含むコレステロール定量試薬（以下、「定量試薬」という）を添加混合して特定リポ蛋白画分中のコレステロール量を測定する方法である。

## 【0034】

その具体的な例としては、検体にコレステロールデヒドロゲナーゼと補酵素（NAD）を混和し、ついでコレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼなどを含有するコレステロール測定試薬を添加する方法、検体にコレステロールデヒドロゲナーゼとNADを混和し、ついでコレステロールエステラーゼ

などを含有するコレステロール測定試薬を添加する方法、検体とコレステロールオキシダーゼをパーオキシダーゼ、4-アミノアンチピリンあるいはカタラーゼなどと共に混合したのちコレステロールエステラーゼなどを含有するコレステロール測定試薬を添加する方法、検体とコレステロールオキシダーゼをパーオキシダーゼ、4-アミノアンチピリンなどと共に混合したのちコレステロールエステラーゼ、コレステロールデヒドロゲナーゼ、NADなどを含有するコレステロール測定試薬を添加する方法などを挙げることができるが、これに限定されるものではない。

#### 【0035】

特定のリポ蛋白画分中のコレステロールを測定する方法としては、公知の酵素的測定法のいずれも用いる事ができるが、例えば酵素試薬としてコレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼを組み合わせて用いる方法、コレステロールエステラーゼ及びコレステロールデヒドロゲナーゼを組み合わせて用いる方法等が挙げられる。

#### 【0036】

本発明においては、前処理反応である第一反応に使用される酵素と、定量方法である第二反応のコレステロール測定に使用される酵素は、同一でもまた異なっても差し支えない。また第一反応において、過剰量の酵素を使用しこれを第二反応に使用しても差し支えない。要は、リポ蛋白表面に存在する少量の遊離型コレステロールを消費し（第一反応／前処理反応）、次いで測定すべき特定のリポ蛋白のみに酵素が作用する状態として当該リポ蛋白を構成する大部分のコレステロール（遊離型コレステロール＋エステル型コレステロール）を定量できるようにすればよいのである。

#### 【0037】

また、これらのコレステロール測定用酵素試薬を添加した後、最終的にコレステロールを検出する方法は特に制限されず、例えばパーオキシダーゼと色原体や、ジアホラーゼあるいは電子受容体と還元系発色試薬をさらに組み合わせて行う吸光度分析、補酵素や過酸化水素を直接検出する方法なども利用することができる。補酵素は補酵素リサイクリング系により増幅しても良い。

【0038】

本発明方法を容易に実施するためには、これに適した特定のリポ蛋白中のコレステロールを測定するための定量用キットを用いることが好ましい。

このようなキットは、上での説明に基づき容易に設計することができるが、その例を、遊離型コレステロールを基質とする酵素の代表としてコレステロールオキシダーゼを用いる場合と、コレステロールデヒドロゲナーゼを用いる場合に分けて示せば次の通りである

【0039】

[コレステロールオキシダーゼの場合のキット]

(イ) 次の試薬 (1) および (2)

(1) コレステロールオキシダーゼおよび過酸化水素消費物質を含む第1試薬

(2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質、コレステロールエステラーゼおよび発色剤を含む第2試薬

よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

(ロ) 次の試薬 (1) および (2)

(1) コレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼおよび過酸化水素消費物質を含む第1試薬、

(2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質および発色剤を含む第2試薬

よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

(ハ) 次の試薬 (1)、(2) および (3)

(1) コレステロールオキシダーゼおよび過酸化水素消費物質を含む第1試薬

(2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質を含む第2試薬、

(3) コレステロールエステラーゼおよび発色剤を含む第3試薬

よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

【0040】

上記キットにおいて、過酸化水素消費物質とは、コレステロールオキシダーゼとコレステロールの反応により生じる過酸化水素を消費し、消失させる物質をい



い、その例としては、カタラーゼ、4-アミノアンチピリン等のカップラー、トリンダー試薬等の水素供与体を含む酸化還元系発色試薬などが挙げられる。

【0041】

このうち、4-アミノアンチピリン等のカップラーおよびトリンダー試薬等の水素供与体はこれらを組み合わせ、過酸化水素と反応させることにより発色するものであり、上記の(2)または(3)の発色剤として用いられるものである。しかし、本発明の前処理工程で用いる試薬(1)としては、カップラーまたは水素供与体の一方のみを用い、非発色反応で過酸化水素を消費させることが好ましい。もちろん、発色反応させ、測定値の方で調整することも可能である(試薬(1)での発色値を、試薬(2)または試薬(3)の発色値から差し引くことにより調整できる)。

【0042】

[コレステロールオキシダーゼの場合のキット]

(二) 次の試薬(1)および(2)

- (1) コレステロールデヒドロゲナーゼおよび補酵素を含む第1試薬、
- (2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質およびコレステロールエステラーゼを含む第2試薬

よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

(ホ) 次の試薬(1)および(2)

- (1) コレステロールデヒドロゲナーゼおよび補酵素を含む第1試薬、
- (2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質、コレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、パーオキシダーゼおよび発色剤を含む第2試薬

よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

(ヘ) 次の試薬(1)および(2)

- (1) コレステロールデヒドロゲナーゼ、補酵素およびコレステロールエステラーゼを含む第1試薬、
- (2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質を含む第2試薬

よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

(ト) 次の試薬 (1) および (2)

(1) コレステロールデヒドロゲナーゼ、補酵素およびコレステロールエステラーゼを含む第 1 試薬、

(2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質、コレステロールオキシダーゼ、パーオキシダーゼおよび発色剤を含む第 2 試薬

よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

(チ) 次の試薬 (1)、(2) および (3)

(1) コレステロールデヒドロゲナーゼおよび補酵素を含む第 1 試薬、

(2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質を含む第 2 試薬、

(3) コレステロールエステラーゼを含む第 3 試薬

よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

(リ) 次の試薬 (1)、(2) および (3)

(1) コレステロールデヒドロゲナーゼおよび補酵素を含む第 1 試薬、

(2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質を含む第 2 試薬、

(3) コレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、パーオキシダーゼおよび発色剤を含む第 3 試薬

よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

(ヌ) 次の試薬 (1) および (2)

(1) コレステロールデヒドロゲナーゼ、補酵素および補酵素反応生成物消費物質を含む第 1 試薬、

(2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質およびコレステロールエステラーゼを含む第 2 試薬

よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

(ル) 次の試薬 (1) および (2)

(1) コレステロールデヒドロゲナーゼ、補酵素および補酵素反応生成物消費物質を含む第 1 試薬、

(2) 特定のリポ蛋白のみに作用する物質、コレステロールエステラーゼおよび発色剤を含む第 2 試薬

よりなる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

## 【 0 0 4 3 】

上記のコレステロールデヒドロゲナーゼを用いるキットにおいて、補酵素反応生成物消費物質とは、コレステロール、コレステロールデヒドロゲナーゼおよび補酵素（例えばNAD）の反応により生じる還元型補酵素（例えばNADH）を再び元の補酵素に戻す物質をいい、その例としては、乳酸脱水素酵素とピルビン酸（基質）の例が挙げられる。上記のキットでは、いずれも試薬（1）の添加により補酵素の反応生成物が生じるが、このうち、（二）、（へ）、（ち）および（ヌ）において、反応生成物を消費せずに、そのまま、測定段階において試薬（1）添加による発色と同じ波長の光を測定する場合には、試薬（2）または試薬（3）による発色値から、試薬（1）を添加した前処理の段階での発色値を差し引くことにより、特定のリポ蛋白中のコレステロールを定量することができる。また試薬（1）に、予め反応生成物を消費する物質を添加しておき、これを消費してから試薬（2）または試薬（3）を添加して発色させてもよい。この際、試薬（2）または試薬（3）には、反応生成物を消費する物質の作用を減じる物質を配合した方がよい。一方、キット（ホ）、（ト）、（リ）および（ル）では、前処理の発色とは別の波長の発色を測定することになるので、必ずしも測定値から前処理の発色値を差し引かなくてもよい。

## 【 0 0 4 4 】

## 【発明の効果】

本発明によれば、遠心分離などの機械的前処理はもちろん、ポリアニオン等を用いることなく、簡便な操作で効率良く特定画分中のコレステロールを定量することが可能となる。そして、ポリアニオン等での沈殿を生じることがないので、測定装置（特にセル）等が汚れることがなく、また、測定値のばらつきも生じないので、従来のコレステロール測定方法に比べ優れたものである。

## 【 0 0 4 5 】

更に、後記実施例に示すように、中性脂肪レベルが高い検体についても従来の沈殿法と相関の高い測定値が得られるものであり、試料を選ばない点でも優れたものである。

## 【 0 0 4 6 】

このように、本発明方法は少ない試料で、簡便な操作により、広い範囲の試料について正確で、かつ特異的な測定が可能であるため、種々の自動分析装置に適用でき、臨床検査の領域に置いても極めて有用である。

【0047】

# 【実施例】

次に、実施例を挙げて本発明をさらに説明するが、本発明はこれらに何ら制約されるものではない。

【0048】

## 実施例 1

下記に示す本発明法および沈殿法により、リポ蛋白質を含む30例の血清検体について、HDL中のコレステロールを定量し、これらの測定値を比較した。結果を図1に示す。

【0049】

## (本発明法)

検体3 $\mu$ lに、0.1単位/mlのコレステロールデヒドロゲナーゼ(天野製薬製)、2.5mMのNADおよび4-アミノアンチピリン0.03%を含む10mMのりん酸緩衝液(第1試薬; pH8.5)300 $\mu$ lを添加した(前処理)。約5分後、エマルゲンB-661%、コレステロールエステラーゼ(旭化成)1.3単位/ml、コレステロールオキシダーゼ(旭化成)2単位/ml、パーオキシダーゼ(東洋紡)5単位/ml及びジスルホブチルメタトルイジン0.04%を含む100mMのMES緩衝液(pH6)からなるコレステロール測定試薬(第2試薬)100 $\mu$ lを加えた。

【0050】

第2試薬直前と添加後5分後の600nmにおける吸光度を測定し、その差より血清検体中のHDLコレステロール濃度を求めた(2ポイント法)。また、校正用物質として濃度既知のコントロール血清を用いた。なお、以上の操作は、日立7150型自動分析装置を用いて行った。

【0051】

## (沈殿法)

HDL C2「第一」分画試薬（第一化学薬品株式会社製） $200\mu\text{l}$ を検体 $200\mu\text{l}$ と混和し、 $3000\text{rpm}$ で10分間遠心分離を行った。この上清 $50\mu\text{l}$ を採取し、Triton X-100 1%、コレステロールエステラーゼ1単位/ $\text{ml}$ 、コレステロールオキシダーゼ1単位/ $\text{ml}$ 、パーオキシダーゼ5単位/ $\text{ml}$ 及びジスルホブチルメタトルイジン0.04%、4-アミノアンチピリン0.04%を含む100mMのMES緩衝液（pH6.5）からなるコレステロール測定試薬3mlと混合し、 $37^{\circ}\text{C}$ で10分間インキュベートした後、 $600\text{nm}$ における吸光度を測定し、HDL中のコレステロール濃度を求めた。

【0052】

( 結 果 )

結果を表1および図1に示す。

【表1】

検体番号	沈 殿 法 (mg/dl)	本発明法 (mg/dl)	検体番号	沈 殿 法 (mg/dl)	本発明法 (mg/dl)
1	73	72	16	54	54
2	39	39	17	45	47
3	53	52	18	60	59
4	54	54	19	50	52
5	57	58	20	58	56
6	75	71	21	38	39
7	51	51	22	56	55
8	52	50	23	35	37
9	43	43	24	29	31
10	58	58	25	63	60
11	59	59	26	51	50
12	49	51	27	33	36
13	44	46	28	52	51
14	70	65	29	65	63
15	35	38	30	47	49

この結果より明らかなごとく、本発明方法はポリアニオン等を使用しないにもかかわらず、従来の沈殿法と極めて良好な相関を示していた。

【0053】

実 施 例 2

実施例 1 の第 1 試薬のコレステロールデヒドロゲナーゼ、NAD およびりん酸緩衝液を 5 単位／m l のコレステロールオキシダーゼ（東洋紡）、5 単位／m l のパーオキシダーゼ（東洋紡製）および 1 0 0 m M M E S （p H 6）に代え、測定値を比較した。結果を表 2 に示す。

【0 0 5 4】

（ 結 果 ）

結果を表 2 および図 2 に示す。

【表 2】

検体番号	沈 殿 法 (mg/dl)	本発明法 (mg/dl)	検体番号	沈 殿 法 (mg/dl)	本発明法 (mg/dl)
1	7 3	7 3	1 6	5 4	5 4
2	3 9	3 8	1 7	4 5	4 7
3	5 3	5 2	1 8	6 0	6 1
4	5 4	5 6	1 9	5 0	5 0
5	5 7	5 7	2 0	5 8	5 5
6	7 5	7 4	2 1	3 8	3 7
7	5 1	5 2	2 2	5 6	5 6
8	5 2	5 0	2 3	3 5	3 5
9	4 3	4 4	2 4	2 9	2 9
1 0	5 8	5 8	2 5	6 3	6 1
1 1	5 9	5 7	2 6	5 1	5 2
1 2	4 9	5 1	2 7	3 3	3 3
1 3	4 4	4 5	2 8	5 2	5 2
1 4	7 0	6 9	2 9	6 5	6 6
1 5	3 5	3 7	3 0	4 7	4 6

この結果より明らかなごとく、本発明方法はポリアニオン等を使用しないにもかかわらず、従来の沈澱法と極めて良好な相関を示していた。

【0 0 5 5】

### 実 施 例 3

実施例 1 及び実施例 2 の試薬を用い、中性脂肪レベルの異なる血清 5 検体を測定し、従来法と測定値を比較した。この結果を表 3 に示す。

【0 0 5 6】

【表 3】

	沈 殿 法 (mg/dl)	実施例 1 の値 (mg/dl)	実施例 2 の値 (mg/dl)	中性脂肪の値 (mg/dl)
検体 1	4 7	4 9	4 9	1 9 8
検体 2	4 9	5 0	4 9	3 0 1
検体 3	2 6	2 7	2 4	7 4 2
検体 4	6 0	6 1	6 1	5 1 7
検体 5	3 7	4 0	3 6	4 2 8

【 0 0 5 7 】

表 3 に示すように、本発明によれば中性脂肪レベルが高い検体についても従来法と同レベルの測定値が得られた。

【図面の簡単な説明】

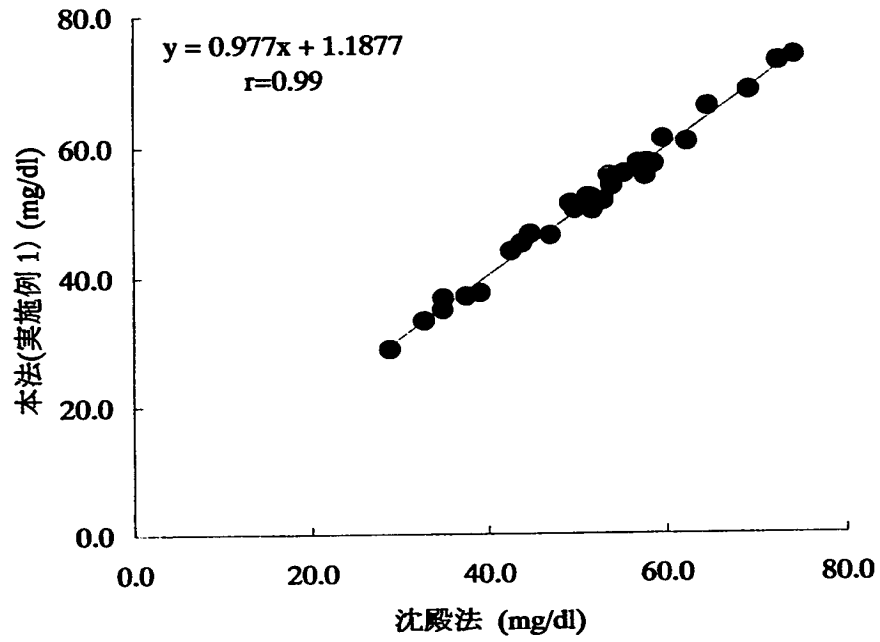
【図 1】 実施例 1 における本発明と沈殿法の相関関係を示す図面。

【図 2】 実施例 2 における本発明と沈殿法の相関関係を示す図面。

以 上

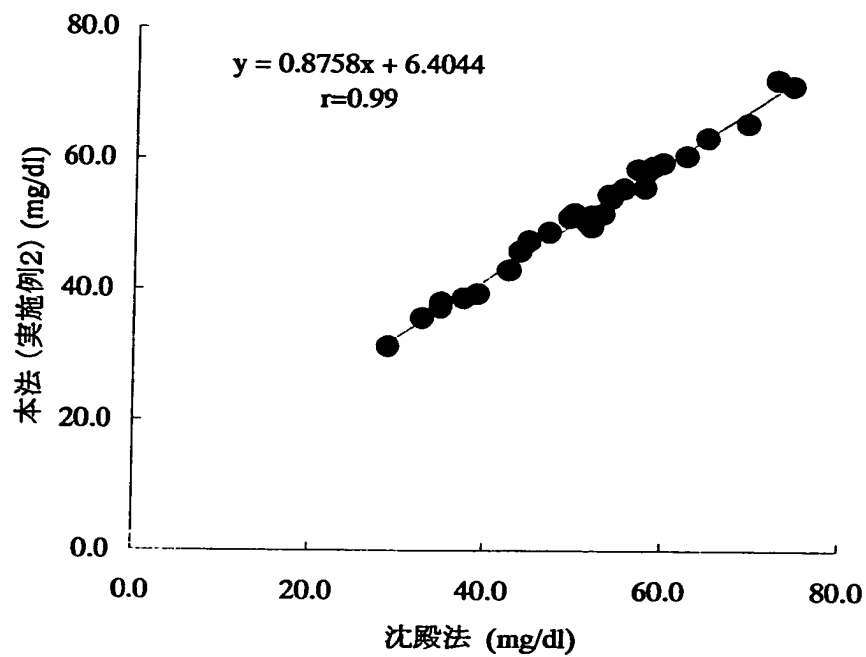
【書類名】 図面

【図 1】





【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 基本的にポリアニオン等を必須とせず、簡便な操作で正確に、かつ効率よく特定画分中のコレステロールを定量する事ができ、種々の自動分析装置に好適に使用される方法を提供すること。

【解決手段】 試料中の特定のリポ蛋白中に存在するコレステロールを測定するに先立ち、リポ蛋白を含む試料に遊離型コレステロールを基質とする酵素を作用させることを特徴とするコレステロール定量用試料の前処理方法およびこれを利用する特定のリポ蛋白中のコレステロール定量法並びにこの定量法に用いられる特定のリポ蛋白中のコレステロール定量用キット。

【選択図】 図 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 3 9 0 0 3 7 3 2 7 ]

1. 変更年月日 1 9 9 0 年 1 2 月 1 2 日

[ 変更理由 ] 新規登録

住 所 東京都中央区日本橋 3 丁目 1 3 番 5 号

氏 名 第一化学薬品株式会社

